

氏 名	あおき しゅん 青木 駿
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 272 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士期課程 薬学専攻
学 位 論 文 題 目	電極に固定した電気化学活性 DNA における電荷移動 速度の鎖長依存性に関する研究ならびに同手法を用い た応用研究
論文審査委員	
（主査）	教 授 友廣 岳則
（副査）	教 授 水口 峰之
（副査）	准教授 井上 将彦 （指導教員）

論文内容の要旨

遺伝子検査を用いた医療の需要は、近年飛躍的に増加している。現在、遺伝子検査は主に酵素反応と蛍光検出を組み合わせで行われているが、装置や手技が煩雑であり、このことが遺伝子検査の普及のための障害となっている。これらの問題を解決するため、申請者の所属する研究室では、電気化学的手法に基づいた新たな遺伝子検査手法を開発してきた（図 1）。この手法では、目的とする DNA 配列について、相補となる一本鎖のプローブ DNA を用いる。このプローブは、5' 末端に電気化学応答部位としてのフェロセン-イソキノリン共役体 (**FcIq**) を、3' 末端に金表面へ固定化するための炭素数 3 のチオールをそれぞれもつ。このプローブを金薄膜電極上に固定し、ターゲット DNA を作用させることで電極上に二重鎖を形成させる。このとき、形成される二重鎖にミスマッチが含まれるか否かによって、二重鎖自体の折れ曲がり柔軟性は大きく異なる。この柔軟性の違いは末端に連結された **FcIq** から電極への電荷移動速度に影響を与え、より柔軟なミスマッチ含有二重鎖では電荷移動はより速くなる。電荷移動速度の違いは、サイクリックボルタンメトリー (CV) から求まる速度定数 k を指標として、定量的に比較できる。また、電荷移動速度の違いは、方形波ボルタンメトリー (SWV) を用いた電気化学測定によって On-Off 型の電流応答として簡便に評価することもできる。申請者の所属する研究室では、この手法を用いた一塩基多型や一塩基挿入・削除といった種々の遺伝子変異の検出を報告してきた。

一方で、電極上に固定した DNA における電荷移動の機構については、現在においても未解明な部分が残っている。我々は **FcIq** から電極への電荷移動は、二重鎖の bending を介して直接的に起こると説明している。しかし、他種の電気化学応答部位を用いた研究の中には、電荷移動は二重鎖の塩基対が導線のように働くことで起こると主張するものもあり、電荷移動の機構については現在でも活発な議論がなされている。申請者はこのような議論の一助となるべく、第一章では DNA の鎖長と電荷移動速度との関係を実験的・理論的に考察し、電荷移動が bending を介することを証明した。また本手法のさらなる応用として、第二章では光損傷塩基を含む二重鎖の物性評価を、第三章では一本鎖 DNA 上で進行する酵素的デアミネーションの追跡を行った。

第一章 電極固定 DNA を介した bending による電荷輸送の速度と DNA 鎖長との相関関係の実験的・理論的評価¹⁾

申請者はこの電気化学的手法を、遺伝子変異の検出にとどまらない多種多様な用途へ応用しようと考えていた。しかし、このような応用を行うためには、本手法での電荷移動の作動原理についてさらなる理解が必要であると判断した。特に、電荷移動が bending を介することの立証は、その機構を前提に評価系を組む応用研究を行うためには必要不可欠なものである。そこで本研究では、二重鎖の鎖長と電荷移動速度との相関関係について調査を行うこととした（図 2）。実験的に観察された相関関係を、bending を仮定して理論的に説明することによって、電荷移動の機構を証明できると考えたからである。

プローブ DNA には、アデニンホモオリゴマーである **Fc-A_m** (5'-FcIq-A_m-(CH₂)₃-SH-3', $m = 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 39$) および繰り返し配列をもった **Fc-(AAT)_n** (5'-FcIq-(AAT)_n-(CH₂)₃-SH-3',

$n = 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13$) を用いた。二重鎖における電気化学測定を行う前に、一本鎖のプロープを用いて電気化学測定を行い、それぞれの鎖長をもったプロープの電荷移動速度定数 k を測定した (図 3a)。一本鎖の場合、他研究グループによる報告と同様に、鎖長を決定する塩基数 N の逆数 $1/N$ と k 値とが比例することが実験的に示された。一方で、電極上でハイブリットを行った二重鎖においては、 $1/N$ に対して k の自然対数 $\ln k$ が比例するという結果を得た (図 3b)。この結果について理論的な考察を試みたところ、bending による電荷移動を仮定したときにのみ説明が可能であることがわかった。また鎖長と k 値との相関についてさらなる知見を得るため、ターゲット鎖上の隣接した 2 つのグアニン塩基が cisplatin によって架橋された二重鎖を用いて実験を行った。このような二重鎖は、架橋部位で 40° 程度屈曲することが知られている。したがってこの架橋二重鎖を用いることで、塩基対の数を一定にしたまま **FcIq** を電極に近づけることができる。15 bp の長さをもった二重鎖に cisplatin 架橋を行うと、**FcIq** と電極との距離は一塩基対短い 14 bp の野生型二重鎖のものに近くなることが予想された (図 4)。実際にこれらの二重鎖において電気化学測定を行ったところ、架橋された二重鎖の k 値は、短くした二重鎖に近い値となった。

以上、電荷移動速度と二重鎖の鎖長との関係より、電荷移動は塩基対内部を介しているのではなく、申請者らが従来から主張していた通り bending を介して起きていることが示された。

第二章 光損傷塩基を含んだ DNA 二重鎖の bending 特性の評価²⁾

第二章では、本電気化学手法を応用することで、光損傷塩基を含んだ二重鎖の物性評価を行った。紫外線照射による DNA の損傷は、いくつかの分子変換の結果であることが報告されているが、その中でも隣接したピリミジン塩基の二量体形成はよく知られている。この二量体には、cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct (6-4PP) という 2 種類の化学種が含まれる (図 5)。本研究では、これらの損傷塩基が含まれた二重鎖の電気化学測定によって bending 特性を評価し、野生型と比較した。

電気化学測定のため、二種類のプロープ DNA (**Fc1**, **Fc2**) と光二量体を含む 14 mer と 16 mer の相補鎖 (**CPD₁₄**, **6-4₁₄**, **CPD₁₆**, **6-4₁₆**) を合成した。プロープ DNA を電極上へ固定した後、相補鎖を作用させることで、光損傷塩基を含んだ二重鎖を電極上に形成させた。また比較のため、光損傷を含まない野生型の相補鎖 (**Wild₁₄**, **Wild₁₆**)、AP site アナログ (**AP^{THF}**) を導入した相補鎖 (**AP₁₄**, **AP₁₆**)、及び一塩基、二塩基ミスマッチとなる相補鎖 (**TA₁₄**, **AA₁₄**, **TA₁₆**, **AA₁₆**) も合成し、同様に電極上で二重鎖を形成させた。それぞれの DNA 固定電極について電気化学測定を行い、電荷移動速度定数 k を比較した (図 6)。14 mer のプロープ **Fc1** を用いた場合、 k 値は以下のような順序で大きくなる傾向がみられた **Wild₁₄ \approx CPD₁₄ < AP₁₄ \approx TA₁₄ < 6-4₁₄ \approx AA₁₄**。また 16 mer のプロープ **Fc2** でも同様な比較を行ったところ、 k 値の順序は **Fc1** のときとほぼ同様であった。本実験系において、 k 値は二重鎖の柔軟性を反映した値であると考えることができ、この値が大きいほど二重鎖はより柔軟であると考えられる。したがって、CPD を含んだ二重鎖は野生型の二重鎖とほぼ同じ柔軟性であるのに対して、6-4PP を含む場合には二重鎖は顕著に柔軟になっていることが推測される。この違いは、それぞれの損傷塩基が元の野生型塩基の構造からどれだけ逸脱しているかに由来していると考えられる。CPD は 2 つの隣接した塩基間が二箇所て連結されており、それぞれの塩基部分は平行に近い位置に配置されている。したがって、水素結合部位の形状は二量体形成の前後でほとんど変化していない。一方で 6-4PP では、2 つの塩基は垂直に連結されている。そのためプロープと通常の塩基対を形成することができず、ミスマッチ

の場合と同様に非常に柔軟な二重鎖を形成していると考えられる。この推察は、二重鎖の T_m 値と k 値とに負の相関が観察されたことから支持される(図 6)。

このように、ピリミジン塩基の光二量化によってできる二種類の損傷塩基は、二重鎖の物性に異なる影響を与えることが判明した。光損傷塩基の修復において、その初期段階には紫外線損傷 DNA 結合タンパク UV-DDB の損傷部位への結合が必要とされる。この際、このタンパクは二重鎖中の CPD よりも 6-4PP に強く結合することが知られている。本研究によって示された光損傷含有二重鎖の柔軟性の違いは、この会合強度の違いに影響している可能性がある。

第三章 APOBEC3G による DNA デアミネーションの電気化学的な追跡³⁾

APOBEC3G (A3G) はヒト由来の DNA デアミナーゼである。この酵素は一本鎖 DNA (ssDNA) 上で dC を dU へと変換する活性を持つ。この作用によって、HIV-1 ゲノムの変異あるいはウイルス DNA の切断を誘導し、感染抑制に関与する。本研究では上記の電気化学的手法を応用することで、A3G による ssDNA デアミネーションの追跡を行った。ssDNA 上で進行するデアミネーションの検出には、いくつかの方法が知られている。しかしながら、これまで報告されている手法のほとんどは、酵素反応後の制限酵素による切断や、PCR による増幅を必要とするため、煩雑で高コストであるという問題点があった。今回、我々は電気化学的手法を用いてデアミネーションを検出することで、より簡便で低コストな分析手法の確立を目指した。

申請者の所属する研究室では、適切な周波数での SWV 測定によって、ミスマッチとフルマッチとの区別を電流の On-Off で区別することに成功している。今回はこの手法を酵素反応後の成績体へと応用し、酵素反応の追跡を行った。A3G によるデアミネーションは、5'-d(CCC)-3' という配列において 3' 側から順に 2 段階で進行することが知られている(図 7)。そこで、基質ならびに各段階の成績体に対し相補となる 15 mer の Fc-DNA (Fc-GGG、Fc-GGA、Fc-GAA) を設計、合成した。ここにおいて、3 塩基分の相補配列はプローブのほぼ中央に配置した。続いてそれぞれのプローブにおいて、フルマッチの場合にのみ大きなピーク電流を与えるよう周波数を設定した。これによって、それぞれのプローブに対して完全相補となる原料や成績体の量比が電流値に反映されることとなる。そこで、一定時間酵素処理を行った相補鎖を用いて SWV 測定を行い、そのピーク電流値を測定した(図 8)。その結果、それぞれのプローブを用いることによって、酵素反応時間の経過に伴う基質、中間体、最終生成物の増減が電流応答から見積もられた。また、生成可能性のあるその他の成績体に対して、それぞれ相補となるプローブ Fc-AGG、Fc-GAG、Fc-AAA、Fc-AGA を用いた測定結果より、A3G による 2 段階の酵素反応は排他的に進行していることが確認された。

以上のように申請者は、第一章では本電気化学手法について、DNA 鎖長と電荷移動速度との関連性を実験的、理論的に明らかにした。これによって、電荷移動が bending を介することが証明され、今後の応用のための基礎的知見が得られた。また第二章と第三章で、本系の適応可能性について調査を行い、遺伝子検査に限られない広い分野へと応用が可能であることを示した。

参考文献

- (1) Aoki, S.; Chiba, J.; Inouye, M. submitted. (2) Chiba, J.; Aoki, S.; Yamamoto, J.; Iwai, S.; Inouye, M. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 11126–11128. (3) Chiba, J.; Kouno, T.; Aoki, S.; Sato, H.; Zhang, J.-Y.; Matsuo, H.; Inouye, M. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 12115–12117.

図 3 は参考文献 (1)、図 6 は参考文献 (2)、図 8 は参考文献 (3) を参照せよ。

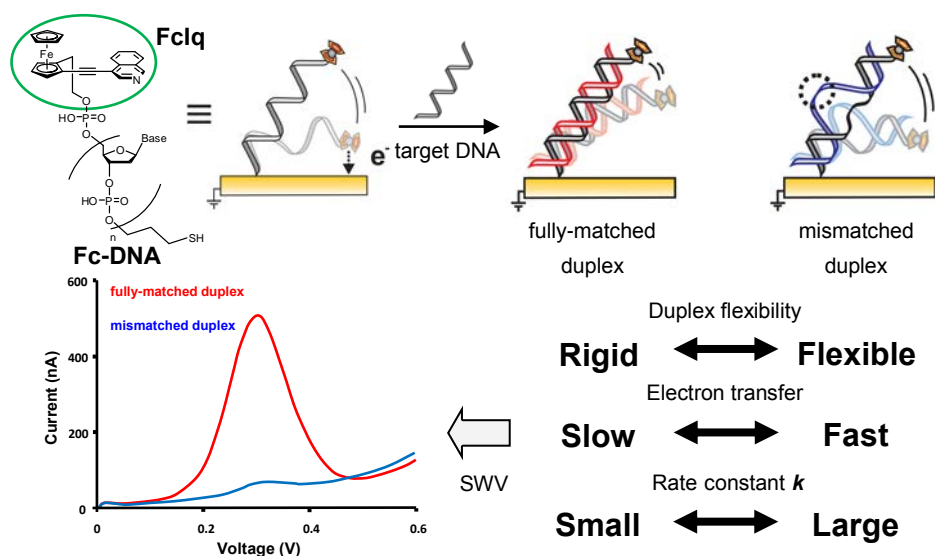


図 1 電気化学的一塩基多型検出法の模式図

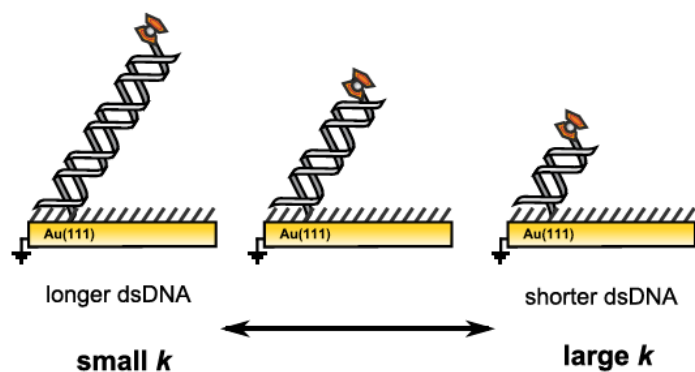


図 2 二重鎖の鎖長と k 値との相関

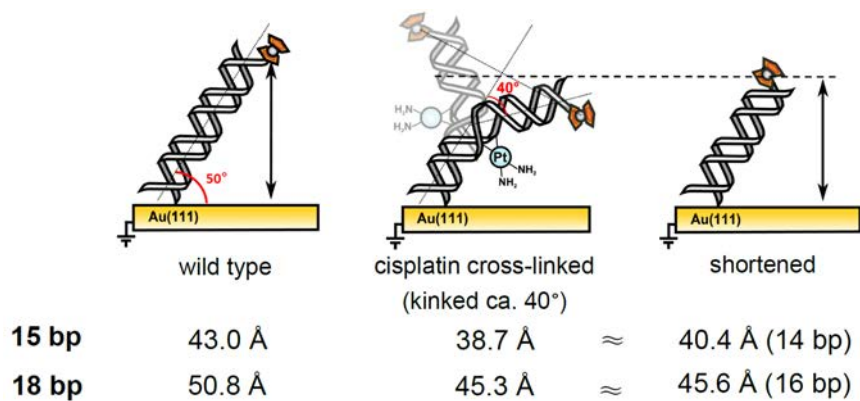


図 4 cisplatin 架橋二重鎖における Fc と電極との距離の比較

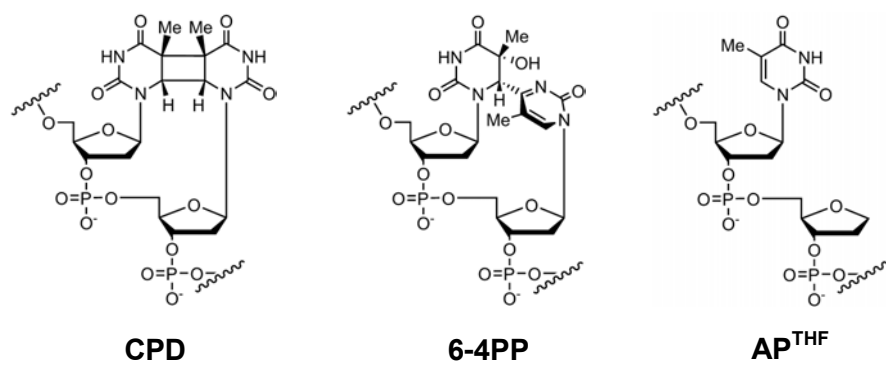


図5 ピリミジン光二量体、及び AP site アナログ (AP^{THF}) の構造



図7 A3G による一本鎖 DNA のデアミネーション

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

遺伝子検査を用いた医療の需要は、近年飛躍的に増加している。しかし現状の蛍光分析を用いた遺伝子検査法には、装置や手技が複雑という問題点がある。これを解決するため学位申請者の所属する研究室では、これまでに電気化学的手法を用いた一塩基多型検出法を開発していた。この手法は金電極上に固定され、末端に電気化学応答部位が連結された一本鎖のプローブ DNA を用いる。このプローブと検体との二重鎖において、電気化学応答部位から電極への電荷移動の速度は、二重鎖中のミスマッチの有無に影響を受ける。したがって電荷移動速度を指標として、ミスマッチの有無を容易に判別できる。この手法を用いて、様々な遺伝子変異の検出が行われてきた。学位申請者はこの手法を遺伝子検査以外の分野にも応用することを考え、研究を遂行した。まず第一章では、二重鎖を介した電荷移動の機構について、これまでとは異なる視点から確認を行った。この研究によって、当該手法において、二重鎖を介した電荷移動は Elastic bending モデルにしたがうことを確認した。また本モデルを前提として、第二章では光損傷塩基を含んだ二重鎖の柔軟性について評価を行い、第三章では一本鎖 DNA 上で進行する酵素的デアミネーションの追跡を行った。

第一章 電極固定 DNA を介した bending による電荷輸送の速度と DNA 鎖長との相関関係の実験的・理論的評価

当該手法における電荷移動の機構について、二重鎖の鎖長 N と電荷移動速度定数 k との相関という観点から調査を行った。実験的に観察された相関を、Elastic bending モデルを仮定して理論的に説明することで、電荷移動の機構の証明を試みた。まず電気化学応答部位が連結された一本鎖のプローブを用いて電気化学測定を行い、それぞれの鎖長をもったプローブの電荷移動速度定数 k を測定した。この結果、他研究グループによる報告と同様に、 $1/N$ と k との比例関係が示された。一方で、これまでプローブに対して相補鎖を作用させた二重鎖では、 N と k との関係は調べられていなかった。そこで申請者は、二種類の配列に対して同様な実験を行い、 $1/N$ に対して $\ln k$ が比例するという結果を得た。二重鎖での実験結果について理論的な説明を試みたところ、Elastic bending モデルを仮定した場合にのみ実験結果を説明できた。したがって本実験系における電荷移動は、Elastic bending モデルにしたがうことが示された。また cisplatin によって架橋された二重鎖での実験結果より、 k 値は鎖長 N に直接影響を受けるのではなく、 N に依存したパラメータである電気化学応答部位と電極との平均距離 d に影響を受けることも明らかにした。

第二章 光損傷塩基を含んだ DNA 二重鎖の bending 特性の評価

当該の電気化学手法を応用し、光損傷塩基を含んだ二重鎖の物性評価を行った。紫外線照射によって生じるチミン二量体には、cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct (6-4PP) の 2 種類が存在する。本研究では、損傷塩基が含まれた二重鎖について k 値の比較を行い、ここから二重鎖の柔軟性を評価した。CPD

を含む二重鎖は野生型の二重鎖に近い小さな k 値を与えた一方で、6-4PP を含む二重鎖の場合には比較的大きな k 値を与えた。この結果より 6-4PP は CPD よりも二重鎖を柔軟にする傾向が強いことが示された。 T_m 測定の結果、および他研究者らによって報告された光損傷塩基を含む二重鎖の結晶構造を考慮すると、6-4PP は 2 つの塩基が直交するように連結され、水素結合部位の構造が野生型から大きく変化するため、二重鎖はより柔軟になったと申請者は考察した。

第三章 APOBEC3G による DNA デアミネーションの電気化学的な追跡

ヒト由来のデアミネースタンパクである APOBEC3G (A3G) による、一本鎖 DNA のデアミネーションの追跡を当該の電気化学的手法により達成した。A3G は一本鎖上の 5'-CCC-3' を 5'-CCU-3' に変換することが報告されていた。また一方でこの成績体に対して更に酵素反応が進行する可能性も指摘されていた。しかし、この二段階目の反応が明確に確認された例はこれまでなかった。原料、および生成される成績体に対してそれぞれ相補的なプローブを合成し、これらのプローブを用いて酵素反応の進行を確認した。この研究では、方形波ボルタンメトリー (SWV) 測定のピーク電流値を指標とした。周波数を適切に設定すると、フルマッチ二重鎖からの電流値はミスマッチ二重鎖のものより大きく観測される。したがって酵素反応後の混合物とそれぞれのプローブとの二重鎖について SWV 測定を行うと、プローブに対して完全相補となる一本鎖 DNA の量が SWV ピーク電流値に反映される。この手法を用いて、A3G によって 5'-CCC-3' から 5'-CCU-3' への変換が進行していることを示した。更に 5'-CCU-3' を基質とした二段階目の酵素反応によって、5'-CUU-3' が生成していることを初めて確認した。またこの反応は排他的に進行しており、この他の成績体は生成していないことも確認した。

以上、申請者は、本電気化学手法における DNA 鎖長と電荷移動速度との関連性を実験的、理論的に明らかにした。これによって、本実験系では電荷移動は確実に Elastic bending モデルにしたがうことを証明した。また第二章と第三章で、本系の適応可能性について調査を行い、遺伝子検査に限られない広い分野へと応用が可能であることを示した。

主査および副査は、申請者青木駿に面接試験を行うとともに論文内容を綿密に審査し、この論文が博士（薬学）を受けるに十分に値すると判断した。

- (1) 千葉順哉・河野隆英・青木駿・佐藤仁志・Jing Ying Zhang・松尾浩・井上将彦
Electrochemical direct detection of DNA deamination catalyzed by APOBEC3G.
Chemical Communications, No. 48, 12115–12117 頁 (2012 年)
- (2) 千葉順哉・青木駿・山本淳平・岩井成憲・井上将彦
Deformable nature of various damaged DNA duplexes estimated by an electrochemical analysis on electrodes.
Chemical Communications, No. 50, 11126–11128 頁 (2014 年)